

Arginine biosynthesis in organ development and function

Citation for published version (APA):

Marion, M. V. V. (2009). *Arginine biosynthesis in organ development and function*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20090326mm>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090326mm](https://doi.org/10.26481/dis.20090326mm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift staat het aminozuur arginine centraal. Arginine is een voorloper voor de synthese van eiwitten, stikstofoxide, creatine en agmatine, en is een intermediair in de ontgiftiging van ammoniak via de ornithine cyclus. Arginine behoort niet tot de essentiële aminozuren. In zoogdieren vindt de endogene aanmaak van arginine vooral in de proximale tubulus contortus van de nier plaats uit citrulline, dat op zijn beurt uitsluitend in de epitheelcellen van de dunne darm (enterocyten) gevormd wordt uit glutamine of proline. De capaciteit om zelf arginine te synthetiseren is laag in vleeseters zoals katten en fretten, intermediair in de mens, en relatief hoog in snel and blijvend groeiende dieren zoals varkens en knaagdieren. In de volwassen mens voorziet de endogene synthese van arginine onder normale omstandigheden in de dagelijkse behoefte. Onder sterk anabole of katabole omstandigheden wordt een externe bron van arginine noodzakelijk. Om deze reden wordt arginine tegenwoordig een “conditioneel” essentieel aminozuur genoemd. In snelgroeiende pasgeboren zoogdieren voorziet de relatief geringe bijdrage van arginine uit de melk niet in de behoefte voor eiwitsynthese ten behoeve van groei, zodat endogene synthese van arginine in deze periode noodzakelijk is. Verschillende onderzoeken, inclusief onderzoek uit onze groep, wijzen erop dat de darm in deze periode een belangrijker bron van arginine vormt dan de nier.

In hoofdstuk 1 wordt allereerst een overzicht gegeven van het evenwicht tussen de behoefte, de eigen aanmaak, en de stofwisseling van arginine in het lichaam.

Vervolgens wordt de regulering van het transport van arginine over de celmembraan besproken en tenslotte komen de tot nu toe beschreven muizen met een deletie van een van de genen uit de aanmaak, transport, en afbraak van arginine aan de orde.

Transgene "F/A2" muizen brengen arginase-1 in hun enterocyten tot expressie. Het gevolg daarvan is dat F/A2 zuigelingen lijden aan te lage bloedspiegels van arginine, verminderde spier- en haargroei, en een geremde rijping van B cellen. Het arginine deficiëntiesyndroom lijkt op een tekort aan Insuline GroeiFactor (IGF)-1. In hoofdstuk 2 hebben wij daarom de hypothese getoetst of het arginine deficiëntie syndroom het gevolg is van een interactie tussen de GroeiHormoon (GH)/IGF-1 as en de GCN2 stress kinase signaaltransductie route die geactiveerd wordt door een tekort aan een bepaald aminozuur. De activering van GCN2 kan gevolgd worden door de fosforylering van translatie initiatie factor eIF2 α en de concentratietoename van de transcriptiefactoren ATF4 en CHOP te bepalen. Deze bepalingen zijn uitgevoerd in cellen die in vitro gekweekt werden onder verschillende arginine concentraties en in F/A2, Gcn2^{-/-}, of

F/A2//Gcn2^{-/-} muizen. Een tekort aan arginine remt de secretie van GH in hypofyse cellen. In arginine deficiënte F/A2 muizen was de GH eiwitconcentratie in de hypofyse 2.5-voudig verhoogd en de Igf-1 mRNA concentratie in lever en spier 8-10-voudig verlaagd. Tweemaal daags toedienen van GH verhoogde de Igf-1 mRNA concentratie 3-voudig in zowel wildtype als F/A2 muizen, maar stimuleerde de groei niet. In celkweken werd de GCN2 signaaltransductie route geactiveerd zodra de arginine spiegel van het medium onder 50 µM daalde, terwijl IGF-1 myoblast differentiatie stimuleerde indien de arginine spiegel hoger dan 25 µM was. In 1-dag oude F/A2 muizen was de arginine concentratie 4.5-voudig verlaagd en was GCN2 in alle onderzochte organen geactiveerd. Muizen waarvan het Gcn2 gen geïnactiveerd was (Gcn2^{-/-}) vertoonden geen toegenomen ATF4 and CHOP expressie en stierven vlak na de geboorte. Deze waarneming laat zien dat alleen het stress kinase Gcn2 verantwoordelijk was voor de stress kinase response. Op grond van deze waarnemingen hebben wij geconcludeerd dat de symptomen van het arginine deficiëntiesyndroom ontstaan door GCN2 activering, onderdrukking van GH secretie, en remming van de groeistimulerende effecten van IGF-1.

Binnen de afdeling Anatomie & Embryologie zijn de afgelopen jaren "conditionele" knockout muizen gemaakt voor de arginine-gerelateerde eiwitten argininosuccinaat synthetase, arginase-1 en de cationic amino-acid transporter-1. In een conditionele muis wordt een essentieel deel van het structurele gen geflankeerd door een 32bp lang DNA fragment ("loxP") dat de functie van het gen niet beïnvloedt. Doordat dit fragment herkend wordt door een enzym met "recombinase" activiteit ("Cre"), kan het geflankeerde DNA selectief verwijderd worden door kruising met muizen die Cre transgeen tot expressie brengen. Indien de transgene muis Cre via een weefselspecifieke promotor/enhancer tot expressie brengt, wordt een weefselspecifieke knockout verkregen. In hoofdstuk 3 hebben we onze ervaringen met de vervaardiging van deze 3 conditionele knockout muizen samengevat. Belangrijke aspecten om rekening mee te houden blijken te zijn:

De gekozen strategie om de "targeting" vector (het DNA molecule dat modificatie van het DNA in de embryonale stamcel (ES) teweeg brengt) te construeren. Indien een op PCR gebaseerde methode wordt gebruikt om de homologe "armen" van de vector te kloneren, dient bij voorkeur een "bacterial artificial chromosome" (BAC) kloon als uitgangsmateriaal te worden genomen om het aantal amplificatiestappen te

minimaliseren. Ook dienen gebieden waarin veel "repeats" (herhaalde, aansluitend achter elkaar liggende sequenties van ≥ 2 nucleotiden) voorkomen vermeden te worden omdat ze moeilijk foutloos te amplificeren zijn.

De selectie van de recombinante ES kloon voor injectie in blastocysten. Om te bewerkstelligen dat de geselecteerde kloon daadwerkelijk alleen homoloog gerecombineerde ES cellen bevat dienen geselecteerde ES klonen voortdurend onder selectiedruk gekweekt te worden om de overleving van wildtype cellen te voorkomen. De eerste screening tegen "random integration" van een targeting vector in het DNA van een ES cel kan het best geschieden door aan de zijde van de "lange" homologe arm een stuk vector DNA te laten zitten. Deze vector sequentie komt niet voor in het DNA van de ES cel en verdwijnt bij homologe recombinatie. De aanwezigheid ervan bewijst random integratie.

Screening op homologe recombinatie met behulp van een lange PCR aan de zijde van de "korte" homologe arm van de targeting vector is sneller en informatiever dan de klassieke Southern blot. Een nadeel van deze aanpak is dat het te gebruiken paar PCR "primers" pas niet kan worden getest en geoptimaliseerd voordat de recombinante ES kloon beschikbaar is.

Sondes ("probes") om Southern blots te screenen dienen, indien ze uit intronen afkomstig zijn, te worden gecontroleerd op de aanwezigheid van repeats. Een probe van ~300bp blijkt voldoende lang te zijn voor een gevoelige en specifieke selectie. Na selectie met ganciclovir om de selectiecassette te verwijderen dienen ES klonen opnieuw gesequenced te worden omdat ganciclovir mutageen gebleken is.

Succesvol homoloog gerecombineerde ES cellen zijn slechts op één van beide allelen gemodificeerd. De kleur van de vacht is een goede marker voor de aanwezigheid van homoloog gerecombineerde cellen in de kiembaan van chimere muizen. Dit kan van groot belang zijn indien niet onmiddellijk muizen met een gefloxt gen worden verkregen. De zorg dat de activiteit van transgeen Cre recombinase onvoldoende is om twee gefloxt allelen in één cel te verwijderen is ongegrond gebleken. De beste genotypes om de fysiologische effecten van gen deletie te bestuderen blijken flox/flox and flox/flox-Cre te zijn, omdat het fenotype van dieren met één constitutief en een conditioneel verwijderd allel moeilijk te interpreteren is.

Afwezigheid van het enzym ornithine transaminase of ornithine transcarbamoylase veroorzaakt een ernstig tekort aan arginine in pasgeboren muizen en

mensen, omdat endogene synthese van citrulline nodig is om het voor groei te geringe gehalte aan arginine in de melk te compenseren. Pasgeborenen verschillen van volwassenen in de zin dat de enzymen die nodig zijn voor de synthese van arginine uit citrulline in sterke mate tot expressie komen in de epitheelcellen ("enterocyten") van de dunne darm. In hoofdstuk 4 hebben wij het belang van de arginine synthese in de dunne darm voor de arginine voorziening van de muizenzuigeling onderzocht door het enzym argininosuccinaat synthetase (ASS) selectief in de enterocyten van de dunne darm te elimineren. Eliminatie van ASS expressie werd bewerkstelligd door $Ass^{fl/fl}$ muizen (in deze muizen wordt exon 13 van het Ass gen geflankeerd door loxP sites) te kruisen met transgene "Vil" muizen (deze muizen brengen het recombinase Cre selectief in de enterocyten tot expressie). Om de bijdrage van ASS activiteit buiten de darm te beperken werden bovendien $Ass^{fl/fl}$ met Vil muizen gekruist. De gevolgde strategie bleek effectief om ASS expressie in de enterocyten geheel te elimineren. Desondanks ontstond geen tekort aan arginine in muizenzuigelingen met het Vil/ $Ass^{fl/fl}$ of Vil/ $Ass^{fl/fl}$ genotype (de verschijnselen van een tekort aan arginine in zuigelingen zijn in hoofdstuk 2 beschreven). De systemische eliminatie van één Ass allel deed de circulerende citrulline spiegel met $\sim 50\mu M$ toenemen, terwijl de eliminatie van een Ass allel in de enterocyten verantwoordelijk was voor een additionele stijging met $\sim 80\mu M$. Met behulp van microsferen konden we aantonen dat $\sim 80\%$ van het bloed dat door de lever van 14 dagen oude muizen stroomt van de vena portae afkomstig is en $\sim 20\%$ van de arteria hepatica. Ten opzichte van wildtype (Vil/ $Ass^{+/+}$) muizen bleek de arginine productie in alle experimentele genotypes effectief geëlimineerd, terwijl de citrulline productie, zoals verwacht, toegenomen was. In zuigelingen dragen de nieren nog nauwelijks bij aan de productie van arginine omdat de doorstroming van de nier slechts $\sim 20\%$ vertegenwoordigt van dat wat door het maagdarmkanaal stroomt. Deze resultaten tonen aan dat arginine synthese in de dunne darm niet essentieel is voor muizenzuigelingen.

Een van de eerste kenmerken van disfunctie van het endotheel (de cellen die bloedvaten bekleden) is een vermindering van de productie van het vaatverwijdende stikstofoxide (NO) uit arginine. Het relatief milde fenotype van muizen waarin alle 3 NO synthetiserende (NOS) enzymen zijn geëlimineerd impliceert dat een tekort aan NO op zich niet zeer pathogeen is. NOS enzymen produceren NO en citrulline in aanwezigheid van arginine en de co-factor tetrahydrobiopterine. Als een van beide in onvoldoende mate aanwezig is, "ontkoppelt" NOS en produceert het het zuurstofradicaal superoxide in

plaats van NO. Op grond hiervan hebben wij gehypothetiseerd dat een tekort aan arginine schadelijker is voor de functie van het endotheel dan een tekort aan NO. Om die reden hebben wij (hoofdstuk 5) de effecten van een selectieve eliminatie van ASS en arginase-1 in het endotheel nagegaan door $Ass^{fl/fl}$ of $Arg1^{fl/fl}$ muizen te kruisen met Tie2-Cre muizen (deze muizen brengen het Cre recombinase selectief in het endotheel tot expressie). ASS en het endotheel specifieke NOS3 komen samen tot expressie in het arteriële endotheel van jonge wildtype muizen, terwijl Arginase1 daarin (nog niet) tot expressie komt. Arteriën zonder ASS of Arginase1 expressie in het endotheel verschilden niet van wildtype arteriën in hun vernauwing na blootstelling aan phenylephrine of in hun verwijding na blootstelling aan acetylcholine. Alleen na herhaalde inductie van vaatvernauwing en -verwijding bleek dat toevoeging van arginine aan het orgaanbad de vaatverwijding in arteriën zonder ASS herstelde, terwijl citrulline (zoals verwacht) geen effect had. Na dezelfde voorbehandeling bleken arteriën zonder Arginase1 daarentegen gevoeliger voor toegevoegd arginine en citrulline dan wildtype controles. Deze voorlopige resultaten laten zien dat resynthese van arginine uit citrulline in het endotheel ook in vivo optreedt en belangrijk is voor een goede functie van het arteriële epitheel.